

氏 名	劉 桂 茹
授 与 し た 学 位	博 士
専 攻 分 野 の 名 称	歯 学
学 位 授 与 番 号	博 甲 第 2009 号
学 位 授 与 の 日 付	平 成 12 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	歯学研究科歯学専攻（学位規則第4条第1項該当）
学 位 論 文 題 名	口腔粘膜上皮異形成、上皮内癌および扁平上皮癌におけるEGFR蛋白過剰発現および遺伝子増幅に関する研究
論 文 審 査 委 員	教授 滝川正春 教授 永井教之 教授 松村智弘

## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

### 【研究目的】

表皮増殖因子受容体(Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR)は細胞膜に存在するチロシンキナーゼを持つ単量体の受容体糖蛋白である。近年チロシンキナーゼ活性は免疫系や神経系を含む様々な細胞の増殖および機能発現において、シグナル伝達制御という点で重要な役割を果たしていることが示された。特に癌原遺伝子は正常細胞において増殖因子や増殖因子受容体およびシグナル伝達蛋白をコードしている遺伝子であることが明らかにされ、癌原遺伝子の変化による増殖機構の異常が細胞癌化機構と密接に関わっていることが解ってきた。EGFR遺伝子はトリ赤芽球ウィルスのv-erbB癌遺伝子と極めて類似していることが見い出された以来、EGFR遺伝子の増幅やおよびその産物の過剰発現が表皮癌由来のA431細胞に初めとして各臓器でこれらの検索がなされた。近年膠芽腫や食道などの扁平上皮癌にEGFR遺伝子の増幅と蛋白の過剰発現は認められることが明らかになるとともに、癌の早期段階や、予後、生存率、リンパ節の転移、局所の浸潤浸潤性などに関連する可能性が示唆されている。しかし前癌病変としての上皮異形成と上皮内癌、および扁平上皮癌におけるEGFR蛋白の過剰発現と遺伝子の増幅については十分に検索されていない。一方、近年微量のDNA検出および定量のために確立されたcompetitive PCR法は従来の $\beta$ -actin等の内部標準遺伝子を用いる方法に比べ、正確な遺伝子定量法として期待されている。そこで本研究では口腔粘膜における上皮異形成、上皮内癌および扁平上皮癌について、EGFR蛋白の発現を免疫組織学的に検索するとともに、同遺伝子の増幅をcompetitive PCR法に基づいて相対定量を行い、両者と扁平上皮癌の病理発生との関係を検討した。

### 【材料および方法】

#### 1. 材料

検索材料は、岡山大学歯学部附属病院で摘出された口腔粘膜の上皮異形成、上皮内癌および口腔粘膜由来扁平上皮癌の生検材料および手術材料である。免疫組織学的に用いた材料は89例で、そのうち検索可能な43例で遺伝子の増幅についても検索した。また、正常口腔粘膜組織8例を対照として用いた。検索材料の組織学的分類はWHOの<Histological Typing of Cancer and Precancer of the Oral Mucosa(1997)>に準じた。

#### 2. 免疫組織学的検索

一次抗体として、EGFR蛋白の細胞外ドメインに反応するモノクローナル抗体(極東製薬)を使用した。一次抗体反応後、SABC法を行いDAB発色させ光顕的に観察した。

### 3. Competitive PCR 法による遺伝子増幅の検索

(a) 増幅領域 : FryeらおよびNeubauerらは報告したプライマーでUllrichら(1984)は報告したEGFR塩基配列の3901-4010の領域、またはGrayら(1982)は報告したInterferon- $\gamma$ 遺伝子の4581-4730の領域を増幅した。(b) Competitor DNA断片の作製 : 上記プライマーでPCR法にて増幅した110bpのEGFR DNA断片より内部23bpを除いたものを使用した。(c) ゲノムDNAの抽出および量の補正 : パラフィン包埋組織から厚さ5  $\mu$ mの切片を作製した。H.E.染色標本で病変部位を確認後、その隣接切片から病変組織を採取した。病変組織からのゲノムDNAの抽出は、DEXPET<sup>TM</sup> (TAKARA) にて行った。精製したゲノムDNAは、Interferon- $\gamma$ 遺伝子を用いてサンプル間のDNA量を補正した。(d) EGFR遺伝子の相対定量 : 補正した各サンプルDNAとCompetitor DNAを同じPCR反応液中に入れ、上述のプライマーで同時に増幅させた。PCR反応後、12%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後、染色強度によりEGFR遺伝子の増幅を相対定量した。

#### 【結果】

##### 1. 免疫組織化学によるEGFR蛋白の染色結果

正常口腔粘膜ではEGFR蛋白は、一部の上皮基底細胞の細胞膜に弱陽性所見が見られた。上皮異形成では軽度異形成において、基底細胞および基底細胞側の棘細胞の細胞膜に陽性所見を示した。中程度異形成において、基底細胞及び棘細胞の細胞膜が強陽性或いは陽性を示した。重度異形成において角化層を除くほぼ全層の細胞で強陽性を示したが、基底細胞において特に強い陽性所見が見られ、また単一の上皮細胞の細胞膜も強陽性を示した。上皮内癌においては上皮全層にわたり陽性を示したが、特に基底部細胞の一部で胞巣状に強陽性所見が見られた。扁平上皮癌ではすべての症例にEGFR蛋白の陽性所見が認められたが、強陽性細胞の局在様式は二つのパターンを示した。一つは癌胞巣の辺縁部に存在する癌細胞の細胞膜に強陽性を、もう一つは浸潤先端部の小塊状或いは索状胞巣ですべて癌細胞の細胞膜あるいは細胞質に強陽性を認めた。

##### 2. Competitive PCRによるEGFR遺伝子増幅の検索結果

正常口腔粘膜の上皮ではEGFR遺伝子の増幅は認められなかった。EGFR遺伝子の増幅は上皮異形成において17% (18例中に3例、そのうち軽度異形成では2例中0例、中程度異形成では8例中1例—増幅率2倍、重度異形成では8例中2例—増幅率3倍)、上皮内癌において40% (5例中に2例—増幅率3倍)、扁平上皮癌において20% (20例中に4例—増幅率4倍以上) の症例に認められた。

#### 【まとめ】

口腔粘膜扁平上皮癌の発生過程に於いては、EGFR蛋白の過剰発現は軽度上皮異形成を含む全ての発生段階で認められ、その程度は発癌に従って増加した。一方、EGFR遺伝子の増幅は全ての症例に認められなかったが、中程度上皮異形成から増幅を認めた症例があった。増幅率は発癌に従って高値を示し、EGFR蛋白の過剰発現と相関していた。従って、EGFR蛋白の過剰発現の程度と遺伝子増幅率の増加は口腔粘膜の扁平上皮癌の病理発生に関与する因子であると考えられた。

## 論文審査結果の要旨

表皮増殖因子受容体 (EGFR) 蛋白は、細胞膜に存在するチロシンキナーゼを持つ単量体糖蛋白である。このEGFR蛋白をコードする遺伝子は、トリ赤芽球ウイルスのv-erbB癌遺伝子と極めて類似している癌原遺伝子として注目され、遺伝子の変化やコードする蛋白の発現について各臓器の悪性腫瘍で検索されてきた。本研究は、上皮異形成、上皮内癌を含む口腔粘膜の前癌病変と扁平上皮癌における、EGFRの蛋白発現や遺伝子増幅量の変化を免疫組織化学法及びCompetitive PCR法を用いて、口腔扁平上皮癌の病理発生との関係を検討したものである。その結果、以下のことを明らかにした。

1. EGFR蛋白の発現は軽度な上皮異形成であっても、上皮内癌や扁平上皮癌と同じく過剰発現が認められ、その程度は細胞異型程度に従って増加した。

2. 作製したCompetitor DNAの量を用い、標準サンプルのゲノムDNA量と異なる比でCompetitive PCRを行った結果、PCR増幅産物量の比が初期DNA量の比を正確に反映することを確認し、EGFR遺伝子とCompetitor DNAのPCR増幅産物量の比值は真の遺伝子増幅の増幅率を表すことを検証した。

3. EGFR遺伝子の増幅は全ての症例には認められなかったが、中程度上皮異形成の段階から増幅を認めた症例があった。増幅率は上皮異形成、上皮内癌、扁平上皮癌に従って高値を示した。

以上の研究結果は、口腔粘膜扁平上皮癌の病理発生の基礎的な研究として評価できる。よって、本申請論文は学位論文の価値に足るものと認める。